

Aus dem Institut für Experimentelle Gerontologie, Basel (Direktor: Prof. Dr. F. Verzář)
und dem Anatomischen Institut der Universität Basel
(Direktor: Prof. Dr. G. Wolf-Heidegger)

Histologische Veränderungen in der Großhirnrinde von Ratten mit Verlust des Erinnerungsvermögens im Alter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Zoltán Gömöri

ungarischer Staatsangehöriger



BASEL (Schweiz)

S. KARGER

NEW YORK



Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. F. Verzář

Tag der Promotion: 18. Dezember 1959

Aus dem Institut für Experimentelle Gerontologie, Basel,
und der Anatomischen Anstalt der Universität Basel

Histologische Veränderungen in der Großhirnrinde von Ratten mit Verlust des Erinnerungsvermögens im Alter*

Von Z. GÖMÖRI

In Untersuchungen über den Einfluß des Alterns auf das Erinnerungsvermögen von Ratten hat *E. J. Verzar-McDougall* (1957) gezeigt, daß es große individuelle Unterschiede gibt: Manche Tiere erinnern sich auch nach Monaten an den Weg durch ein einmal erlerntes Labyrinth, während bei anderen ein vollständiger Schwund der Erinnerung an diese ihnen früher gut bekannte Aufgabe eintrat. Es schien von Interesse, zu untersuchen, ob bei diesen alten, amnestischen Ratten histologische Veränderungen der Großhirnrinde nachweisbar sind.

Gegenüber Erfahrungen an menschlichen Gehirnen bietet der Tierversuch den Vorteil, daß alle Tiere aus derselben Zucht stammen und miteinander vergleichbar sind. Allerdings beschränkt sich diese Untersuchung auf 14 Gehirne, und es konnte nur die Area praecentralis granularis untersucht werden, auf welche ich mich aus technischen Gründen beschränken mußte.

Es handelt sich dabei um alte Tiere, und es war zu berücksichtigen, daß bei diesen bekanntlich Altersveränderungen des Zentralnervensystems vorkommen. Unser Problem verlangt aber nicht die Feststellung dieser, sondern die Untersuchung, ob zwischen alten Tieren mit gutem und solchen mit schlechtem Erinnerungsvermögen histologisch nachweisbare Unterschiede bestehen.

* Eingesandt am 28. Juli 1959.

Literatur

Über Altersveränderungen im Zentralnervensystem gibt es zahlreiche Untersuchungen. Von besonderem Interesse ist im Zusammenhang mit unserer Frage, daß eine Abnahme von Nervenzellen im Alter stattfindet.

Hodge (1894) hat als erster die starke Abnahme der Purkinje-Zellen im Kleinhirn nachgewiesen.

Ellis (1920) hat im menschlichen Kleinhirn diese Abnahme schon nach dem 30. bis 40. Jahr gesehen, wobei starke individuelle Unterschiede vorhanden sind.

Harms (1927) beschrieb sie bei Hunden, Affen und beim Menschen. In einer zweiten Arbeit (1944) bringt er diesen Zellschwund in Zusammenhang mit den Störungen der Muskelkoordination im Alter.

Inukai (1919) kam zu ähnlichen Resultaten bei weißen Ratten von 7 bis 34 Monaten.

Brody (1955) fand beim Menschen in allen Schichten der Großhirnrinde eine Abnahme der Nervenzellen mit dem Alter, insbesondere auch im Gyrus praecentralis, und

Kuhlenbeck (1944) beschreibt bei weißen Ratten ebenfalls die mit dem Alter fortschreitende Abnahme der Nervenzellenzahl der gesamten Hirnrinde.

Economo (1926) hat das Verhältnis des Volumens einer bestimmten Rindenregion zum Volumen der in ihm enthaltenen Nervenzellen als den «Grauzellenkoeffizienten» bezeichnet (GK). *Economo* bestimmte die Zelldichte, die durchschnittliche Größe der Nervenzellen und das Volumen einer bestimmten Region und berechnete daraus den Grauzellkoeffizienten. Diesen fand er für verschiedene Tierarten und Rindenregionen charakteristisch. Zur Bestimmung des GK hat *Chalkley* (1943) die «Treffermethode» eingeführt, die die Untersuchungen wesentlich erleichtert. *Bonin* (1951) bestimmte mit dieser Methode den GK bei Tarsius. Dieser ist im Koniocortex 20, im eulaminären Cortex 9. *Shariff* (1953) erhielt mit dieser Methode ähnliche Werte bei Primaten. *Haug* (1953, 1955), der die Methode kritisch ausbaute, erhielt bei seinen Untersuchungen GK-Werte, die mit der phylogenetischen Reihe zunehmen. Für das Frontalhirn betragen sie: Mensch 65, Pferd 45, Schaf 35, Kaninchen 20. Für die Sehrinde: Mensch 47, Schimpanse 31, Rhesus 19,4, Meerschweinchen 11,5, Maus 8,5.

Bezüglich des Verhältnisses der Nervenzellen zum interzellular-

laren Material hatte schon *Bauer* (1942) die wichtige Feststellung gemacht, daß je höher ein Tier in der phylogenetischen Reihe steht, desto kleiner die Zahl der Nervenzellen pro Volumen wird.

Rebhan (1956) hat aus dem *Economos*-schen Zahlenmaterial den GK – unter Berücksichtigung der von *Haug* (1953) angegebenen Korrekturverfahren – der menschlichen Großhirnrinde mit 47,5 berechnet. Außer dem Grauzellkoeffizienten hat *Haug* (1958) auch den «Gliazellkern-Koeffizienten» bestimmt und konnte aus dem Verhältnis der beiden Koeffizienten gewisse Folgerungen bezüglich der Gehirne Schizophrener machen.

Andere Altersveränderungen sind die Anhäufung von gelbem Pigment (*Hodge*, 1894; *Cannon*, 1928, und *Harms*, 1927).

Sogenanntes «Ceroid-Pigment» häuft sich bei alten Hunden an (*Sulkin und Kuntz*, 1952).

Pigmentbildung beschrieben auch *Altschul* (1938), *Wahren* (1957), *Höpker* (1950), *Wünscher* (1957).

Die bei Menschen im Frontal- und Temporallappen im Alter auftretenden *Drusen* kommen beim Menschen (z.B. *Divry*, 1956), nicht aber bei Tieren (*W. Müller*, 1939) vor.

Schon seit *Cajal* (1906) wurden an Nervenzellen alternder Menschen und Tiere vielfach Kernpyknose, Chromatolyse, Atrophie und Vakuolisierung der Zellen beschrieben (*Ellis, Brody, Inukai* usw. i.c.).

Material und Methodik

Für unsere Versuche verwendeten wir weiße Ratten des Experimentellen Gerontologischen Laboratoriums. Nach früheren Beschreibungen erreichen 50% der Tiere das Alter von 23 ½ Monaten. Einzelne Individuen überleben bis zu 41 Monaten. 30 bis 34 Monate alte Tiere sind nicht selten.

Wir benutzten ausschließlich männliche Tiere. Von diesen waren 7 Tiere 22 Monate, 4 Tiere 31 Monate und 3 Tiere 32 Monate alt. Alle diese 14 Tiere waren vorher bereits viele Monate lang in experimentell psychologischen Labyrinthversuchen getestet, in welchen ihr Lernvermögen sowie ihre Erinnerung geprüft wurden, wie das von *E. J. Verzáz-McDougall* (1957) beschrieben ist. Die Numerierung der Tiere ist dieselbe wie in dieser Publikation.

Für die *histologischen Untersuchungen* wurden die Tiere in Nembutal-Narkose (30 mg/kg, intraperitoneal) vom Herzen aus zuerst mit physiologischer Kochsalzlösung von einer Temperatur von 37° C und anschließend mit 10%igem Formol durchspült. Darauf wurde das Schädeldach abgetragen und das Gehirn mit der Schädelbasis in 10%igem Formol aufbewahrt. Aus äußeren Gründen dauerte diese Fixierung 7 bis 10 Monate. Nach *Haug* (1958) hat aber die Dauer der Formol-Fixierung keinen wesentlichen Einfluß auf die quantitativen Auswertungen. Nach der Formol-Fixierung wurden die Gehirne 24 Stunden in Leitungswasser ausgewaschen, dann für 6 Wochen in mehrmals gewechselten 70%igen Alkohol gebracht und anschließend über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet.

Die Gehirne wurden in der gewünschten Region in 10 μ dicke Schnitte in Serie geschnitten und zur Färbung in üblicher Weise vorbereitet.

Die *quantitativen* Untersuchungen wurden an mit Thionin gefärbten Präparaten durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte nach den Angaben von *Pearse* (1953) für 10 Minuten in einer 0,1 %igen Thionin-Lösung, deren pH mit Hilfe eines Barbituratpuffers nach *Michaelis* auf 3,88 eingestellt war (nach *Pischingers*, bei *Romeis*, 1948), gefärbt. Eine Differenzierung ist bei dieser Methode nicht nötig, so daß die Schnitte anschließend im aufsteigenden Alkohol kurz entwässert und in Kollodium-X eingedeckt wurden.

Für die *qualitativen* Untersuchungen standen neben den vorher erwähnten Thionin-Präparaten von jedem Gehirn jeweils einige Schnitte der gleichen Region zur Verfügung, die mit der Gentianaviolett-färbung für Abnützungspigment nach *Volkman* gefärbt waren.

Die *quantitativen* Untersuchungen bestanden in der Bestimmung der Dicke der Hirnrinde und ihrer einzelnen Schichten, der Bestimmung des Grauzellkoeffizienten und des Gliakernkoeffizienten sowie in der Bestimmung der relativen Zahl der Nervenzellen und Gliazellen.

Für alle diese Untersuchungen wurden von jedem Gehirn jeweils von der gleichen Region 10 Schnitte, die in Serien aufeinanderfolgten, untersucht.

Die *Dicke der Hirnrinde* sowie die der *einzelnen Schichten* wurde mit Hilfe eines Okularmikrometers bei 133facher Vergrößerung gemessen, wobei jeweils der Durchschnittswert von 10 Messungen genommen wurde. Die Summe der Messungen der einzelnen Schichten wich von der Messung der gesamten Rindendicke nicht mehr als 5 % ab.

Als *Grauzellkoeffizienten* (GK) bezeichnet man nach *Economo* (1926) das Verhältnis des Volumens der Hirnrinde zum Volumen der in ihr enthaltenen Nervenzellen, als *Gliakernkoeffizienten* in ähnlicher Weise das Verhältnis Hirnrindenvolumen/Gliakernvolumen. Zur Bestimmung benutzten wir die «Treffermethode», bei der gezählt wird, wie oft ein oder mehrere bestimmte Punkte im Gesichtsfeld auf das zu zählende Objekt, in unserem Falle also auf eine Nervenzelle oder auf einen Gliazellkern, fällt. *Chalkley* (1943) hat in seiner Originalmethode vier «Trefferpunkte» benützt, welche unregelmäßig im Gesichtsfeld verstreut lagen. *Haug* (1955) hat ein Zählfeld von 12 mal 12 Quadraten benützt, so daß er ohne Benützung der vier Ecken 165 «Trefferpunkte» hatte. Für meine Zwecke war es praktisch, ein Zählfeld mit 8 mal 8 Quadraten und 81 «Trefferpunkten» zu verwenden, wobei die Ecken des Zählfeldes innerhalb des Gesichtsfeldes lagen. In jedem der 10 Schnitte wurden in jeder der 6 Schichten 10 Auswertungen gemacht, so daß pro Gehirn 48600 und pro Schicht 8100 Trefferpunkte bestimmt wurden.

Die *Bestimmung der Zellzahl* wurde jeweils nur in einer Schicht, und zwar der Lamina ganglionaris (V) durchgeführt. Nervenzellen und Gliazellen wurden getrennt gezählt. Die Zählungen wurden mit dem gleichen ins Okular eingebauten Zählnetz, mit dem auch der GK und Gliakernkoeffizient bestimmt wurden, vorgenommen. Dieses Zählnetz bedeckt bei der verwendeten Vergrößerung ein Feld von 4624 μ^2 . Die Zahl der in diesem Feld gefundenen Zellen wurde, unter Berücksichtigung der konstanten Schnittdicke von 10 μ , auf die Zahl der in einem Volumen von 0,1 mm³ enthaltenen Zellen umgerechnet. Außerdem mußte berücksichtigt werden, daß ein Teil der Zellen im betrachteten Gesichtsfeld nur angeschnitten ist. Zur Korrektur dieses Fehlers verwendeten wir das von *Haug* (1958) angegebene Verfahren, wobei es sich ergab, daß in unseren Präparaten für die Größe der beobachteten Zellen und die verwendete Schnittdicke die Zahl der tatsächlich vorhandenen Nervenzellen 68,6 % von den gefundenen Zellen beträgt. Für die Gliazellkerne beträgt dieser Wert 74 %.

Die *Bestimmung der Zellgröße* wurde bei 5 Gehirnen an den Nervenzellen der Region durch Messung der größten Breite und größten Länge durchgeführt. Aus der durchschnittlichen Größe der Nervenzellen und der Zelldichte kann man annäherungsweise den GK – in der gleichen Weise, wie dies *Economo* das erstmalig gemacht hat – bestimmen, und hat so eine Überprüfung der mit der Treffermethode gewonnenen Werte.

Die Area praecentralis granularis der Ratte

Da eine Untersuchung des ganzen Gehirns oder selbst nur der ganzen Großhirnrinde nicht möglich war, wurde als erstes Gebiet für diese Untersuchung die Area praecentralis granularis gewählt.

Das Gehirn der Ratte gehört unter die lissenzephalen Hirne. Am frischen Gehirn sind keine größeren Furchen zu sehen. Fixiert man jedoch das Gehirn nur ganz kurz z.B. in 96% Äthylalkohol, dann erscheinen mehr oder weniger deutliche Furchen. Diese sind nicht als echte «Sulci» zu bewerten, weil sich nicht alle Schichten der Hirnrinde krümmen. *Flatau und Jacobsohn* (1899) beschrieben die Furchen der Lissenzephalen und *Hermanides und Köppen* (1903) die der Ratte. Auf der lateralen Oberfläche des Großhirns, oberhalb der gut sichtbaren Fissura rhinalis, welche das Riechhirn vom Stirnhirn abgrenzt, sind drei Furchen vorhanden.

Abb. 1 zeigt schematisch die linke Großhirnhemisphäre. Auf der lateralen Seite verläuft eine auf die Hirnbasis senkrechte Furche

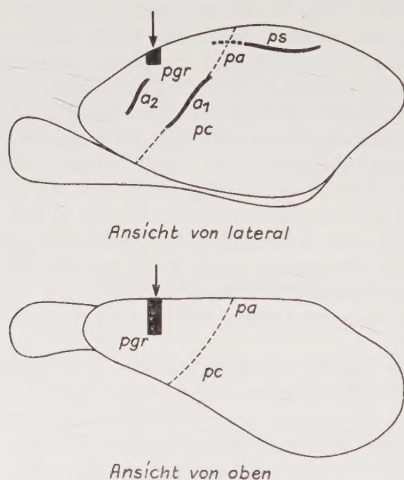


Abb. 1. Schematische Zeichnung der linken Großhirnhemisphäre der Ratte. Ansichten von lateral und von oben. Schwarzes Feld = Stelle der Untersuchung; der Pfeil gibt die Schnittrichtung an. a_1 , a_2 , ps = Sulci; pa = Area praecentralis agranularis; pc = Area postcentralis; pgr = Area praecentralis granularis.

(a_1). Sie war in unserem Material manchmal kaum angedeutet. Eine zweite Furche (ps) verläuft parallel mit der Fissura sagittalis und reicht von hinten in das Gebiet der Area praecentralis, vom zweiten bis etwa über das dritte Viertel der Hemisphäre. In der Mitte des Frontallappens verläuft noch eine dritte, sehr schwach ausgeprägte Furche (a_2).

Die Abgrenzung der Area praecentralis agranularis erfolgte in Anlehnung an die Angaben von Rose (1912, 1929, 1931) für Kaninchen und Maus.

Die Area praecentralis granularis der Ratte gleicht einem Kegelmantel, dessen Spitze nach oben – hinten – lateral gerichtet ist. Die Basis des Kegels wird vom ganzen Frontalpol der Hemisphäre gebildet. Die Grenze nach hinten bildet die Furche a_1 . Auf der Mantelkante und der medialen Fläche liegt das Gebiet der Area frontalis agranularis.

Diese Region wurde auch deshalb gewählt, weil zur Untersuchung ein genügend großes Feld mit parallel liegenden Rindenschichten zur Verfügung steht, die die Bearbeitung vereinfachen.

Rose (1931) hat, zwar nicht bei der Ratte, aber bei Maus und Kaninchen, die folgende Beschreibung gegeben, die ich für die Ratte übernehme: Er spricht von einem Cortex totoparietinus sive pallialis*. Zu diesem gehört die Area praecentralis granularis. Sie hat eine sechs- bzw. siebenschichtige Gliederung, die auch ich für dieses Gebiet bei der Ratte verwende. Die Schichten sind die folgenden:

I. Lamina zonalis

Sie ist breiter als die beiden begrenzenden Regionen (Regio praecentralis agranularis und R. postcentralis). Sie enthält sehr wenig längliche Ganglienzellen, die meistens nicht an Pyramidenzellen erinnern. Die Zellen liegen unregelmäßig verstreut, jedoch gehäuft in der Nähe der Hirnoberfläche. Ihre Größe ist im Mittel 9μ Zellhöhe und $7,5 \mu$ Zellbreite.

Gliazellen sind nur spärlich vorhanden. Ihre Kerne sind längs-oval und färben sich gleichmäßig. Das Faserbild ist arm an tangential verlaufenden dünnen Fasern.

Eine ausgeprägte 2. Schicht, Lamina granularis externa, fehlt in dieser Region bzw. kann von der folgenden 3. Schicht nicht abgetrennt werden. Daher werden die 2. und 3. Schicht zusammengezogen und als eine Schicht betrachtet.

II. + III. Lamina corpuscularis (pyramidalis)

Diese ist etwas breiter als die Lamina zonalis. Sie besteht aus gutgeformten, länglichen Pyramidenzellen, deren Plasma sich stark färbt. Sie haben einen runden, länglichen Kern. Die Zellen sind in mehreren Reihen angeordnet und dichter an der Grenze gegen die

* Entsprechend den neueren Bezeichnungen ist das der Holocortex oder Isocortex.

Lamina zonalis. Die Nervenzellen haben die ideale Form von kleineren Pyramidenzellen, im Mittel von $12/9\ \mu$, mit Grenzwerten von $14/11$ bis $8/7\ \mu$. In dieser Schicht kommen keine anderen Nervenzellformen vor. Die Gliazellen sind spärlich und haben blaßgefärbte Kerne von im Mittel $7,5\ \mu$ Durchmesser.

IV. *Lamina granularis (interna)*

Diese Schicht ist bei der Ratte undeutlich und gibt bei der Auswertung der Zellelemente viele Schwierigkeiten. Die Grenzen sind unscharf, der Übergang in die benachbarten Schichten ist fließend. Die Zellen sind nicht pyramidenartig. Sie liegen unregelmäßig und färben sich verschieden. Es gibt kleinere, runde «Körnerzellen» und größere, längsovale «Spindelzellen». Dementsprechend sind die Werte der Zellgröße sehr verschieden. Es kommen kugelförmige Zellen $14 \times 14\ \mu$ und kleinere $6 \times 6\ \mu$ Durchmesser vor. Die Zelldichte ist geringer als in den anderen Schichten. Die Glia ist reichlicher vorhanden.

V. *Lamina ganglionaris*

Diese ist die am stärksten ausgebildete Schicht und macht ein Drittel der ganzen Dicke dieser Rindenregion aus. Sie besteht aus großen, mehr oder weniger pyramidenförmigen Zellen. Die mittlere Zellhöhe ist $17\ \mu$ und die Zellbreite $14\ \mu$. Die Werte schwanken zwischen $12/10\ \mu$ bis $20,5/15\ \mu$. Die Zellen liegen manchmal etwas dichter im oberen Teil der Schicht, ohne eine eigene «Unterschicht» zu bilden.

Zwischen diesen Pyramidenzellen findet man zahlreiche Gliazellen mit einem Kerndurchmesser von $6,5\ \mu$ sowie einige kleinere, nicht immer differenzierbare Elemente. Die Zellkerne sind rund, meist gut färbbar; einzelne Gliazellkerne färbten sich jedoch kaum.

VI. *Lamina multiformis*

Diese ist die zweitdickste Schicht. Sie besteht aus dichtgefügt, verschieden geformten Zellen, die ohne besondere Ordnung nebeneinanderliegen. Unterschichten sind nicht zu unterscheiden. Die Zellen sind meist spindel- oder kugelförmig. Die kugelförmigen haben Durchmesser von $10/12\ \mu$ und die spindelförmigen von $15/7$ bis $9\ \mu$. Die Zellen färben sich gleichmäßig. Die Kerne der Gliazellen sind blasser.

Tabelle I

Nr.	Alter in Monaten	Rinden- dicke in mm	Grauzellkoeffizient mit Lam. I	Grauzellkoeffizient ohne Lam. I	nur in Lam. V	Gliakernkoeffizient der ganzen Rinde	nur in Lam. V	Lamina V zell- zahl	Lamina V pro 0,1 mm ³ Gliakern- zahl	Zahl der Gliakerne pro Nervenz.	Kern- pykno- se	Zellveränderungen Vakuo- lisation	Hyper- pigmen- tation
Gruppe A													
U 93	22	1,27	24,68	12,61	5,54	46,0	49,0	85,94	84,71	0,98	10	3,4	34
U 96	22	1,46	22,64	13,42	5,63	44,1	48,6	62,23	94,30	1,51	9	2,3	14
W 208	32	1,38	25,45	13,23	6,41	35,6	34,2	105,20	108,69	1,03	18	5,0	12
T 134	31	1,41	24,45	16,01	6,86	46,2	57,9	112,61	89,51	0,79	4	2,4	24
Mittel:		1,38	24,30	13,31	6,11	43,0	47,5	91,49	94,30	1,07	10,25	3,3	21,0
Gruppe B													
U 90	22	1,28	30,52	14,31	6,14	47,3	53,4	63,71	107,09	1,68	32	6,0	20
U 91	22	1,34	31,54	18,41	7,26	62,6	74,1	96,31	103,62	1,07	20	1,5	32
U 92	22	1,27	22,53	10,93	5,07	41,5	44,9	82,97	89,51	1,07	10	—	16
U 95	22	1,39	34,48	19,22	8,59	34,5	33,1	72,60	61,56	0,84	14	3,8	18
T 138	31	1,38	33,02	19,56	7,13	80,7	111,6	111,13	17,56	0,15	10	—	12
W 202	32	1,37	54,90	22,31	7,89	68,4	55,0	54,82	87,31	1,57	18	5,0	12
Mittel:		1,34	35,49	17,45	7,01	55,9	62,0	80,25	77,60	1,06	17,3	4,1	18,3
Gruppe C													
U 98	22	1,58	25,10	15,25	6,66	42,7	35,9	66,67	108,69	1,63	11	8,9	20
T 132	31	1,60	32,36	27,49	8,25	42,1	40,9	50,37	67,13	1,33	6	14,7	44
T 139	31	1,37	27,27	16,67	6,72	55,0	69,3	87,42	41,55	0,47	14	—	15
W 216	32	1,26	34,13	15,42	7,22	45,2	45,2	90,38	75,12	0,83	16	—	9
Mittel:		1,45	31,96	18,70	7,21	46,3	47,8	73,71	73,12	1,07	11,8	11,8	22,0

VII. *Lamina intima*

Diese innerste Schicht ist die dünnste. Sie liegt direkt auf den horizontal verlaufenden Fasern des Balkens. Manchmal findet man hier eine große Zahl von pyramidenförmigen Zellen. Die Zellgröße ist $12/9,5 \mu$. In manchen Schnitten beherrschen Gliazellen das Bild. Ihre Kerne färben sich sehr unterschiedlich; neben ganz blassen, kaum sichtbaren, findet man auch starkgefärbte, chromatinreiche, etwas größere Kerne.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung sind im wesentlichen in Tabelle I zusammengestellt. In dieser sind die verwendeten 14 Tiere in drei Gruppen geteilt, entsprechend den experimentell psychologischen Befunden, welche weiter unten diskutiert werden.

Bei jedem Tier ist das Alter zur Zeit des Todes angegeben.

Dicke der Rinde und ihrer Schichten in der Area praecentralis granularis

Aus dem Vorhergehenden ergab sich, daß die Rinde einen siebenschichtigen Bau aufweist, wobei aber die äußere Granularschicht so schwach ausgeprägt ist, daß man sie zusammen mit der III. Schicht als *eine* Lamina betrachten kann. Diese II. und III. Schicht ist dann relativ breit. Die Lamina IV ist schmal, die Lamina V ist die breiteste und macht oft ein Drittel der gesamten Rindendicke aus. Die Lamina VI ist die zweitbreiteste. Die Lamina VII, die innerste Schicht, ist die dünnste.

In Tabelle I sind die Gesamtrindendicken der 14 untersuchten Gehirne zusammengestellt. In Tabelle II sind die einzelnen Schichtdicken angegeben. In der Tabelle II ist für jede Schicht auch der Prozentwert von der Gesamtcortexdicke angegeben.

Grauzellkoeffizient und Gliakernkoeffizient

Unter Grauzellkoeffizient (GK) versteht man nach *Economo* (1926) das Verhältnis Volumen der Rinde/Volumen der Nervenzellen, unter Gliakernkoeffizient das Verhältnis Volumen der Rinde/Volumen der Gliazellkerne in einer bestimmten Region des Cortex.

Der GK und der Gliakernkoeffizient wurden in der in der Methodik beschriebenen Weise für alle Schichten der Area praecentralis granularis zusammen und für die V. Schicht (Lamina ganglionaris) getrennt bestimmt.

Tabelle II

Dicke der einzelnen Schichten der Rinde in absoluten Werten und in Prozent von der gesamten Rindendicke

Gehirn Nr.	Lamina I mm	Lamina I %	Lamina II + III mm	Lamina II + III %	Lamina IV mm	Lamina IV %	Lamina V mm	Lamina V %	Lamina VI mm	Lamina VI %	Lamina VII mm	Lamina VII %
Gruppe A:												
U 93	0,15	12,0	0,11	8,7	0,15	11,8	0,43	33,8	0,37	33,1	0,068	5,3
U 96	0,12	8,2	0,15	10,3	0,15	10,3	0,50	34,2	0,46	31,5	0,087	5,6
W 208	0,16	11,5	0,20	14,4	0,14	10,1	0,53	38,4	0,28	20,2	0,074	5,4
T 134	0,14	7,4	0,23	12,0	0,13	6,8	0,45	49,7	0,39	20,4	0,074	3,9
Mittel:	0,14	9,77	0,172	11,35	0,142	9,7	0,477	39,02	0,375	26,3	0,075	5,5
Gruppe B:												
U 90	0,11	9,1	0,14	11,5	0,14	11,5	0,41	32,6	0,40	31,2	0,085	6,6
U 91	0,14	10,4	0,16	11,9	0,14	10,4	0,46	24,3	0,37	27,6	0,074	5,5
U 92	0,11	8,7	0,17	13,3	0,13	10,2	0,38	30,0	0,42	33,1	0,069	5,4
U 95	0,14	10,0	0,17	12,2	0,15	10,7	0,42	30,2	0,44	31,6	0,072	5,1
T 138	0,13	9,4	0,17	12,3	0,16	11,5	0,43	31,1	0,42	30,4	0,075	5,4
W 202	0,14	10,2	0,18	13,1	0,13	9,4	0,39	24,8	0,47	34,3	0,069	4,4
Mittel:	0,125	9,6	0,16	12,38	0,141	10,61	0,415	28,8	0,42	31,36	0,074	5,3
Gruppe C:												
U 98	0,15	9,7	0,25	15,8	0,18	11,3	0,42	26,5	0,48	30,3	0,101	6,3
T 132	0,15	9,5	0,30	18,6	0,15	9,6	0,57	34,9	0,36	22,7	0,078	4,7
T 139	0,13	9,4	0,16	11,6	0,12	8,8	0,40	29,1	0,48	35,0	0,084	5,8
W 216	0,12	9,5	0,15	12,0	0,12	9,5	0,48	38,1	0,33	26,2	0,062	5,0
Mittel:	0,132	9,52	0,215	14,5	0,142	9,8	0,46	32,15	0,41	28,55	0,081	5,45

In der Tabelle I sind die GK der untersuchten Gehirne nach der psychologischen Einteilung in drei Gruppen eingeteilt angegeben. In der Tabelle I ist der GK der gesamten Rinde, in einer weiteren Spalte der GK der ganzen Rinde ohne Lamina I angegeben. Da die Lamina I sehr zellarm ist (hohe GK-Werte), wird die Genauigkeit der verwendeten Methode (pro Gesichtsfeld keine oder nur wenige Zellen) gering und die Schwankungen der Werte sehr groß. Deshalb empfahl *Economo* (1926), den GK auch ohne Lamina I anzugeben, was von den späteren Untersuchern ebenfalls befolgt wurde. In einer weiteren Spalte der Tabellen ist der GK der Lamina V gesondert angegeben. Diese Werte sollten zusammen mit den später beschriebenen Werten der Zellzahlen, Zellgrößen und den Beobachtungen über die Zellveränderungen in dieser Schicht ein genaueres Bild über die morphologischen Verschiedenheiten ergeben.

In der Tabelle I sind ferner die Gliakernkoeffizienten angegeben, wobei die Gliakernkoeffizienten für die ganze Rinde mit Lamina I und für die Lamina V gesondert gebracht werden.

Bei allen diesen Bestimmungen wurden alle Zellen gezählt, es wurde kein Unterschied zwischen pathologisch veränderten und normalen Zellen gemacht.

Zahl der Nervenzellen und Gliazellen pro 0,1 mm³ in der Lamina ganglionaris (V)

Die Zahl der Nerven- und Gliazellen pro Volumeneinheit wurde ausschließlich in der Lamina V bestimmt (Tabelle I).

Auch hier wurden sowohl pathologisch veränderte sowie normale Zellen gezählt.

In der nächsten Rubrik finden sich die Verhältniszahlen der Gliazellen zu den Nervenzellen.

Zellveränderungen in der Lamina ganglionaris (V)

Veränderungen der Nervenzellen gegenüber der Norm wurden nur in der V. Schicht näher untersucht, da hier die Nervenzellen am größten sind und die regelmäßigen Formen zeigen, so daß die Beurteilung der Zellen leichter ist als in den anderen Schichten der untersuchten Region.

In den thioningefärbten Präparaten haben die meisten Nervenzellen der V. Schicht ein gut erkennbares Zellplasma mit deutlichen Nissl-Schollen. Der Zellkern ist schwach gefärbt mit einer deutlichen Kernmembran. Im Kern finden sich neben dem deutlich

sichtbaren Nucleolus auch stärker gefärbte Chromatinsubstanzen, die meist der Kernmembran innen anliegen, so daß diese wie homogen verdickt erscheint.

Nervenzellen, die dieses eben geschilderte Aussehen haben, bezeichnen wir als «normal». Die folgenden Abweichungen von diesem normalen Bild wurden beobachtet:

Pyknose des Zellkernes und Chromatolyse. Diese beiden Veränderungen treten immer gleichzeitig auf. Der Kern kann dabei entweder als ganzer hyperchromatisch erscheinen oder das Kernchromatin ist auf einen Punkt innerhalb des Kernes zusammengezogen, wobei der Nucleolus eine exzentrische Lage einnimmt. Die chromatolytischen Veränderungen im Zellplasma bestehen in einer Auflösung der Nissl-Schollen in eine sich nur blaß färbende Plasmasubstanz, die gleichmäßig im Zelleib verteilt erscheint. Die Zellen, die diese Veränderungen zeigen, sind in den meisten Fällen kleiner als die normalen Zellen und zeigen auch keine Pyramidenform mehr.

Vakuolenbildung im Zellplasma. In manchen der pyramidenförmigen Nervenzellen wurden Vakuolen gefunden, die meistens in der gegen die Cortexoberfläche zu liegenden Spitze der Zellen gelegen sind. Sowohl einzelne kleine wie auch mehrere größere optisch leere Vakuolen wurden beobachtet.

Pigmentablagerungen im Zellplasma. Diese wurden in Schnitten untersucht, die nach Volkmann mit Gentianaviolett gefärbt worden waren. Fast in allen Nervenzellen aller untersuchten Tiere wurden in der untersuchten Region geringe Grade von Pigmentablagerungen gefunden. Diese liegen meist in der Gegend der nach der Cortexoberfläche gerichteten Spitze der Pyramidenzellen. Manche der Zellen zeigten dagegen sehr viel Pigmentablagerungen. Als «hyperpigmentiert» wurde eine Zelle dann betrachtet, wenn Pigment auch in den seitlichen und basalen Zellanteilen zu finden war.

In der Tabelle I ist die Häufigkeit dieser drei Veränderungen (Pyknose und Chromatolyse; Vakuolenbildung; Pigmentablagerungen) zusammengestellt. Die Zahlen geben das prozentuale Vorkommen der Veränderungen an. Zur Gewinnung der Werte wurden in der V. Schicht der Regio praecentralis granularis von jedem Gehirn jeweils 100 Zellen, die zufällig ausgesucht wurden, untersucht.

Diskussion

Die Problemstellung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob sich bei alten Ratten Veränderungen in der morphologischen Struktur

der Großhirnrinde feststellen lassen, welche parallel mit dem Verlust des Erinnerungsvermögens und der Lernfähigkeit gehen.

Einleitend wurde erwähnt, daß die untersuchten Tiere dieselben sind, welche von *E. J. Verzáar-McDougall* (1957) in Labyrinthversuchen untersucht waren und zum Teil ein gutes Gedächtnis hatten, zum Teil dieses im Alter verloren haben. Nachdem diese Versuche an Tieren ausgeführt sind, welche ein hohes Alter hatten, ist zu erwarten, daß in ihrer Großhirnrinde altersbedingte Veränderungen gefunden werden. Es kam uns aber nicht auf den Nachweis dieser, sondern ausschließlich auf einen Vergleich von Veränderungen mit Bezug auf die psychologischen Fähigkeiten an.

Eine Einschränkung bedeutet es allerdings, daß nur die Area praecentralis granularis untersucht werden konnte, von welcher wir nicht wissen, ob sie mit den untersuchten psychischen Fähigkeiten in Zusammenhang steht.

Die 14 Ratten, welche histologisch untersucht wurden, können nach Angaben von Dr. *E. J. Verzáar-McDougall* in drei Gruppen aufgeteilt werden:

- a) Tiere, welche das Labyrinth gut gelernt haben und die Erinnerung daran bis in ihr Alter bewahrt haben,
- b) Tiere, welche das Labyrinth gut gelernt hatten, aber dann im Alter einen kompletten Verlust der Erinnerung an dieses zeigten,
- c) Tiere, welche das Labyrinth nie gut gelernt hatten und im Alter auch sich nicht mehr daran erinnerten.

Kurz zusammengefaßt, können wir diese Gruppen so charakterisieren:

- a) Gutes Lernen, gute Erinnerung;
- b) Gutes Lernen, schlechte Erinnerung;
- c) Schlechtes Lernen, schlechte Erinnerung.

Die Bezeichnung der einzelnen Tiere (bzw. Gehirne) in dieser Arbeit ist dieselbe wie in der Arbeit von *E. J. Verzáar-McDougall*, wo Einzelheiten über diese zu finden sind.

In Tabelle I sind alle morphologischen Befunde zusammenfassend für diese drei Gruppen von Tieren dargestellt.

In jeder der drei Gruppen gibt es Tiere, welche im Alter von 22 Monaten, und solche, die im Alter von 31 bis 32 Monaten geprüft wurden.

Für jede Gruppe sind zwar Mittelwerte berechnet worden, doch ist die Zahl der Individuen jeder Gruppe naturgemäß so gering (4 bis 6), daß es keinen Sinn hätte, eine Fehler- und Wahr-

scheinlichkeitsberechnung durchzuführen, was deshalb unterlassen wurde.

Wenn der Verlust des Erinnerungsvermögens von morphologischen Veränderungen begleitet wäre, dann sollte man einen Unterschied zwischen den Befunden der Gehirne der Gruppen B und C gegenüber der Gruppe A finden. Die letztere repräsentiert in dieser Beziehung «normale», «nicht gealterte» Gehirne.

Sowohl in Gruppe B wie in Gruppe C war ein Verlust des Erinnerungsvermögens eingetreten. Aber in Gruppe B war es eine auffallende, plötzliche Veränderung im ganzen Gebaren der Tiere im Alter. Sie hatten bei mehrfachen früheren Versuchen, mit Intervallen von mehreren Monaten, eine vorzügliche Erinnerung an das Labyrinth gehabt und dann beim letzten Versuch einen vollkommenen Verlust der Erinnerung gezeigt.

In Gruppe C dagegen waren die Tiere schon in ihrer Jugend unfähig, das Labyrinth fehlerlos zu lernen, ohne daß wir für das mangelhafte Lernvermögen eine spezielle Ursache angeben könnten. Vielleicht war die Ursache dieselbe, die bei der Gruppe B viel später den Verlust der Erinnerung verursachte. Man kann sie also entweder als eine Gruppe für sich oder auch gemeinsam mit Gruppe B betrachten.

Vergleicht man in Tabelle I die Individuen dieser Gruppen bezüglich der 12 histologischen Einzelfaktoren, die untersucht wurden, so läßt sich nur bezüglich dem *Grauzellkoeffizienten* eine bestimmte Korrelation zu den Gruppen feststellen. Der *GK mit Lamina I* ist in Gruppe A in 4 Fällen: 22,64 bis 25,45, in Gruppe B in 5 Fällen von 6: 30,52 bis 54,90 (eine Ausnahme mit 22,53) und in Gruppe C in 3 Fällen von 4: 27,27 bis 34,13 (mit einer Ausnahme von 25,10).

Die Verhältnisse liegen ähnlich, obwohl etwas weniger deutlich, wenn man den *GK ohne Lamina I* oder den *GK* nur für *Lamina V* berechnet. Dieselben «Ausnahmen» der Gruppen B und C fallen auch hier aus der Reihe, aber es gibt sowohl in Gruppe B wie in C je noch einen weiteren überschneidenden Wert.

Alles in allem stehen den 4 Tieren mit gutem Gedächtnis mit *GK* von 22,64 bis 25,45 bzw. 12,61 bis 16,01 bzw. 5,54 bis 6,06 6 Tiere gegenüber mit Gedächtnisverlust mit *GK*: 27,27 bis 54,90 bzw. 18,41 bis 27,49 bzw. 7,13 bis 8,59. 2 Tiere geben überschneidende Werte für *GK mit Lamina I*, und 2 weitere Tiere mit *GK ohne Lamina I* und *GK für Lamina V*.

Wir schließen, daß einige Wahrscheinlichkeit dafür besteht,

daß bei Tieren mit im Alter abnehmendem Erinnerungsvermögen der Grauzellkoeffizient der Area praecentralis granularis zunimmt.

Nachdem der GK das Verhältnis des Volumens der Rinde zum Volumen der Nervenzellen angibt, bedeutet dieses Ergebnis, daß das Volumen der Nervenzellen im Verhältnis zum ganzen Rindenvolumen abgenommen hat bei den Tieren, welche im Alter das Erinnerungsvermögen verloren.

Die Gesamtdicke und damit das Volumen der Rinde zeigen bei den Tieren mit schlechtem Erinnerungsvermögen keine wesentliche Abnahme. Daraus würde sich ergeben, daß das Nervenzellvolumen auch absolut geringer ist.

Für die Leitung der histologischen Arbeit und wertvolle Kritik und Hilfe danke ich Herrn Dr. *H. G. Schwarzscher* vom Anatomischen Institut der Universität.

Die Überlassung der experimentell psychologisch geprüften Tiere und die Korrelation der histologischen zu den experimentell psychologischen Befunden verdanke ich Frau Dr. *Jean Verzář-McDougall*.

Die Arbeit ist mit Unterstützung der Muscular Dystrophy Association im Gerontologischen Laboratorium von Prof. Dr. *F. Verzář* ausgeführt worden, wofür ich meinen Dank ausdrücke.

Zusammenfassung

1. Es wurde untersucht, ob bei Gedächtnisschwund alter Tiere morphologische Veränderungen des Großhirns nachweisbar sind.

2. Bei 14 Ratten, bei welchen in einer früheren Arbeit in Labyrinthversuchen das Erinnerungsvermögen geprüft worden war, wurde im Alter von 22 bis 32 Monaten die Area praecentralis granularis histologisch untersucht.

3. Die Zahl der Nervenzellen sowie Gliazellen pro Volumeneinheit, deren Verhältniszahl, der sogenannte Gliakoeffizient, sowie die bei alten Tieren stets vorhandenen Nervenzellveränderungen zeigten keine Parallelen mit den psychologischen Befunden. Sowohl die Dicke der Hirnrinde als auch die der einzelnen Laminae zeigten keine auffallenden Unterschiede. Dagegen war:

4. Der Grauzellkoeffizient, d. h. die Verhältniszahl zwischen dem Volumen der Rinde zur Nervenzellmasse bei den 4 Tieren mit gutem Erinnerungsvermögen im Alter deutlich geringer als bei 6 bis 8 Tieren mit im Alter geschwundenem Erinnerungsvermögen. 2 (bzw. 4) Tiere gaben überschneidende Werte.

5. Es kann deshalb nur mit einiger Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß mit dem Verlust des Erinnerungsvermögens

eine Vergrößerung des Grauzellkoeffizienten, d. h. eine Abnahme der Masse von Nervenzellsubstanz einhergeht.

Summary

1. An investigation was made whether any morphological changes of the large brain could be shown in cases of loss of memory in old rats.

2. In 14 rats which had been tested in a labyrinth for their memory capacity, the area praecentralis granularis was histologically investigated at the age of 22 to 32 months.

3. The number of nerve cells and the glia cells per volume unit, the ratio of which is the so-called glia coefficient, and also the cell changes which are always present in the old animals, showed no parallel with the psychological findings. The thickness of the cortex and of the individual laminae showed no marked difference. On the other hand,

4. the grey cell coefficient, i. e. the ratio between the volume of the cortex and the nerve cell mass, in 4 animals with good memory in old age was less than in 6 to 8 animals which showed loss of memory in old age. Two (resp. 4) rats showed overlapping values.

5. It can therefore be concluded only with some probability that the loss of memory is connected with a high grey cell coefficient, that is, with a reduced mass of nerve cell substance.

Résumé

1° L'auteur a cherché à savoir s'il était possible de mettre en évidence des modifications morphologiques du cerveau chez des animaux âgés présentant des troubles de la mémoire.

2° L'Area praecentralis granularis de 14 rats âgés de 22 à 32 mois et dont les fonctions mnémoniques avaient été préalablement testées par des épreuves de labyrinthe, fut étudiée histologiquement.

3° Le nombre de cellules nerveuses et névrogliales par unité de volume, leur proportion, le soi-disant coefficient glionévroglique et les modifications cellulaires séniles ne sont nullement parallèles aux modifications psychologiques constatées.

4° Par contre, le rapport numérique entre le volume du cortex et celui des cellules nerveuses chez les 4 animaux ayant gardé une bonne mémoire pendant leur vieillesse est plus faible que chez 6 à 8 animaux ayant une mauvaise mémoire. 2 (ou 4) animaux ont donné des valeurs intermédiaires.

5° On peut donc conclure avec vraisemblance qu'il se produit, lors de la perte de la mémoire, consécutive au vieillissement, une diminution du volume des cellules nerveuses par rapport au volume total du cerveau.

Literaturverzeichnis

- Altschul, R.: Über das sogenannte «Alterspigment» der Nervenzellen. Virchows Arch. path. Anat. 301: 273 (1938).
- Bauer, K. F.: Einige Bemerkungen zur Frage der haarscharfen Grenzen der zyto-architektonischen Rindfelder des Menschen. Anat. Anz. 93: 51–62 (1942).
- Bonin, G. v.: The isocortex of tarsius. J. comp. Neurol. 95: 387–428 (1951).
- Brody, H.: Organisation of the cerebral cortex. III. A study of ageing in the human cerebral cortex. J. comp. Neurol. 102: 511–556 (1955).
- Cajal, S. R.: Die Struktur der sensiblen Ganglien des Menschen und der Tiere. Ergebn. Anat. EntwGesch. 16: 177–215 (1906).
- Cannon, B.: Zit. nach Bourne, G. H.: Ageing from a biological and cellular point of view; in: Modern trends in geriatrics (Butterworth, London 1956).
- Chalkley, H. W.: Method for quantitative morphologic analysis of tissue. J. nat. Cancer Inst. 4: 47–53 (1943).

- Divry, P.*: De la notion d'amyloïdose cérébrale dans les processus séniles; in: Experimentelle Altersforschung, 112–120 (Birkhäuser, Basel 1956).
- Economo, V.*: Ein Koeffizient für die Organisationshöhe der Großhirnrinde. *Klin. Wschr.* 5: 593–595 (1926).
- Ellis, R.*: Norms for some structural changes in the human cerebellum from birth to old age. *J. comp. Neurol.* 32: 1 (1920). – A preliminary quantitative study of Purkinje cells in normal, subnormal and senescent human cerebella, with some notes on functional localization. *J. comp. Neurol.* 30: 229 (1919).
- Flatau, E. und Jacobsohn, L.*: Handbuch der Anatomie und vergleichenden Anatomie des Centralnervensystems der Säugetiere I (Berlin 1899).
- Harms, J. W.*: Alterserscheinungen im Hirn von Affen und Menschen. *Zool. Anz.* 74: 249 (1927). – Altern und Somatod der Zellverbandtiere. *Z. Altersforsch.* 5: 73 (1944).
- Haug, H.*: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. *Z. Anat.* 118: 302–312 (1955). – Remarks on the determination and significance of the gray-cell coefficient. *J. comp. Neurol.* 104: 473–492 (1956). – Der Grauzellkoeffizient des Stirnhirns der Mammalia in einer phylogenetischen Betrachtung. *Acta anat.* 19: 60–100 (1953); *Acta anat.* 19: 153–190 (1953); *Acta anat.* 19: 239–270 (1953). – Der Grauzellkoeffizient der primären sensorischen Hirnrinde des Menschen. *Anat. Anz.* 102: 385–388 (1956). – Quantitative Untersuchungen an der Schrinde (G. Thieme, Stuttgart 1958).
- Haug, H. und Rebhan, I.*: Der Grauzellkoeffizient der menschlichen Hirnrinde nach dem Zahlenmaterial v. *Economus*. *Acta anat.* 28: 259–287 (1956).
- Hermanides, S. R. und Köppen, M.*: Über die Furchen und über den Bau der Großhirnrinde bei Lissencephalen, insbesondere über die Lokalisation des motorischen Zentrums und der Sehregion. *Arch. Psychiatr.* 37: 616–634 (1903).
- Hodge, C. F.*: Changes in ganglion cells from birth to senile death. Observations on man and honey bee. *J. Physiol.* 17: 129 (1894).
- Höpker, W.*: Das Altern des Nucleus dentatus. *Z. Altersforsch.* 5: 256 (1951).
- Inukai, T.*: On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. comp. Neurol.* 30: 229 (1919).
- Kuhlenbeck, H.*: Senile changes in the brain of Wistar Institute rats. *Anat. Rec.* 88: 441 (1944).
- Müller, W.*: Ergebnisse vergleichender pathol.-anatomischer Untersuchungen des Gehirns unter besonderer Berücksichtigung der Altersveränderungen. *Arch. Psychiatr.* 109: 147 (1939).
- Pearse, A. G. E.*: Histochemistry (Churchill, London 1953).
- Rebhan, L.*: Der Grauzellkoeffizient der menschlichen Hirnrinde. *Acta anat.* 27: 361–386 (1956).
- Romeis, B.*: Mikroskopische Technik (Leibnitz, München 1948).
- Rose, M.*: Histologische Lokalisation der Großhirnrinde bei kleineren Säugetieren. *J. Psychol. Neurol.* 19: 391–479 (1912). – Cytoarchitektonischer Atlas der Großhirnrinde der Maus. *J. Psychol. Neurol.* 40: 1–51 (1929). – Cytoarchitektonischer Atlas der Großhirnrinde des Kaninchens. *J. Psychol. Neurol.* 43: 353–440 (1931).
- Shariff, G. A.*: Cell counts in the primate cerebral cortex. *J. comp. Neurol.* 98: 382–400 (1953).
- Sulkin, N. N. und Kuntz, A.*: Cit. nach *Bourne, G. H.*: Ageing from a biological and cellular point of view; in: Modern trends in geriatrics (Butterworth, London 1956).
- Verzár-McDougall, E. J.*: Studies in learning and memory in ageing rats. *Gerontologia* 1: 65–85 (1957).
- Wahren, W.*: Neurologischer Beitrag zu Fragen des Alterns. *Z. Altersforsch.* 10–11: 343 (1957).
- Wünscher, W.*: Die Anatomie des alten Gehirns. *Z. Altersforsch.* 11: 60–75 (1957).
- Adresse des Autors: Dr. Z. Gömöri, Institut für Experimentelle Gerontologie, Nonnenweg 7, Basel (Schweiz)